

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Oncologia Médica

### **Estudo do SNP rs2274223 do gene PLCE1 numa população portuguesa de doentes com cancro colorrectal**

José Miguel de Brito Rações Franco Frazão

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Oncologia Médica

### **Estudo do SNP rs2274223 do gene PLCE1 numa população portuguesa de doentes com cancro colorrectal**

José Miguel de Brito Rações Franco Frazão

**Orientado por:**

Dr.ª Marta Sofia Alves Martins

---

**JULHO'17**

## **Resumo**

Como um dos membros da família das fosfolipases C e portanto com papel importante na cadeia de sinalização celular, a Fosfolipase C $\epsilon$ 1 (PLC $\epsilon$ 1) desempenha um papel em vários processos celulares críticos, como sejam a proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e crescimento. Tem ainda a particularidade única de possuir um centro de ligação a proteínas G e a Ras. Para além disso está relacionada com o desenvolvimento da inflamação, que desempenha um papel importante no aparecimento de cancro colorrectal (CRC).

Neste trabalho, através de qPCR, analisámos 68 amostras de DNA de pacientes com CRC diagnosticado e 79 controlos saudáveis para o polimorfismo rs2274223 A>G na tentativa de estabelecer uma associação com CRC. Os resultados mostraram que este polimorfismo tem um efeito protector, particularmente em homozigotia mutada, em relação ao aparecimento de CRC na globalidade (GG v. AA/AG OR=0.7744, 95% CI: 0.327-1.835, p=0.6478). Foi ainda traçada uma curva de sobrevivência que revelou que a homozigotia mutada (GG) tem efeito no aumento da sobrevivência dos pacientes com CRC (p<0.0001). Estes resultados abrem a possibilidade de este polimorfismo poder ser utilizado como biomarcador para o CRC.

Palavras-chave: rs2274223 - PLC $\epsilon$ 1 – CRC

## **Abstract**

As a member of the Phospholipase C family and thus with a role on the cellular signalization pathway, the Phospholipase C $\epsilon$ 1 (PLC $\epsilon$ 1) plays a role in several cell-critical processes, such as proliferation, survival, metabolism and growth. It also has the unique feature of having a Ras and G protein binding domain. Moreover it plays a role in the development of inflammation, which is a known mechanism for the development of colorectal cancer (CRC).

In this work, through qPCR, we analyzed 68 DNA samples of patients with diagnosed CRC and 79 healthy controls for the polymorphism rs2274223 A>G in an attempt to establish an association with CRC. The results showed that this SNP has a protective effect regarding the global development of CRC, especially the mutated homozygous (GG) (GG v. AA/AG OR=0.7744, 95% CI: 0.327-1.835, p=0.6478). A survival curve was also drawn and it showed that the mutated homozygote (GG) has an effect on the survival of CRC. This opens the door for it being used as a possible biomarker in CRC.

Keywords: rs2274223 - PLC $\epsilon$ 1 – CRC

## Índice

Introdução .....	2
Materiais e Métodos .....	6
Resultados.....	6
Discussão .....	13
Conclusão .....	17
Bibliografia.....	18

À Diana e ao Bartolomeu,

Aos meus pais e irmãos,

Que tanto ajudaram e ensinaram ao longo destes anos.

## Introdução

O Cancro é um problema de saúde pública global, doença cuja incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Não obstante os óbvios avanços na terapêutica ao longo da última década, o cancro colorrectal (CRC) ocupa o segundo lugar relativamente a mortalidade por cancro na Europa.<sup>1</sup>

No decorrer dos últimos 5 anos foram realizados vários estudos que identificaram uma associação entre um polimorfismo de único nucleótido (SNP) no gene da Fosfolipase Cε 1 (*PLCE1*) e o risco de cancro.

Em 2010 Abnet et al. realizaram um estudo de associação no genoma total (GWAS) no cancro gástrico (GC) e cancro de células escamosas do esófago (ESCC) numa população chinesa, que identificou variantes de *PLCE1* com uma correlação significativa no desenvolvimento destes dois tipos de cancro. Simultaneamente, Wang et al. identificaram dois genes de susceptibilidade, *PLCE1* e C20orf54, envolvidos no desenvolvimento de GC e ESCC na população chinesa. Mais tarde, Wu et al. identificaram sete SNP para o gene *PLCE1* que se encontravam associados com ESCC. O SNP rs2274223, já reportado nos estudos anteriores, estava entre os SNP identificados.

Após estes estudos iniciais, vários outros estudos foram realizados, focando-se na importância do SNP rs2274223 no desenvolvimento de outro tipo de tumores. Os resultados têm sido inconclusivos.

Em relação ao cancro colorrectal os resultados são contraditórios. Se Li et al. publicaram que o polimorfismo rs2274223 A>G na *PLCE1* poderia ter efeito protector na população chinesa<sup>2</sup>, Xue et al. e Zhang et al. publicaram estudos onde defendem que o rs2274223 está associado a uma maior susceptibilidade ao CRC na população chinesa<sup>3,4</sup>. Do mesmo modo, os mesmos autores sugerem que este polimorfismo associado à exposição a factores de risco tais como alimentação rica em gorduras, consumo de álcool, exposição a carcinogénicos ambientais, infecções por vírus e bactérias, aumentam o risco de desenvolver CRC, e recomendam que as pessoas que possuam os alelos de risco deveriam tentar evitar os factores de risco em questão e ser examinadas mais precocemente<sup>5,6</sup>.

O gene da Fosfolipase Cε (PLCε), localizada em 10q23, é uma das 13 isoformas da família de enzimas Fosfolipase C (PLC), – com papel importante na sinalização

celular, catalisando a hidrólise de Fosfatidilinositol-2-fostato ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol-3-fostato ( $\text{IP}_3$ ) e dialcilglicerol (DAG). Estes dois mensageiros são essenciais na transdução de sinal de virtualmente todos os mamíferos e em alguns eucariotas inferiores<sup>7</sup>. Uma vez presente no citoplasma, o  $\text{IP}_3$  vai ligar-se a canais de cálcio existentes no retículo endoplasmático e promover a sua libertação para o citoplasma da célula. Já o DAG vai activar a proteína kinase C e outras proteínas efectoras de DAG<sup>7</sup>.

Esta isoforma, ao contrário das outras proteínas desta família, tem a particularidade de poder ser regulada por GTPases da família Ras ou proteínas G heterotriméricas. Para além disso, possui na sua estrutura um domínio CDC25 GEF, que é um centro catalisador de GTP e que permite, por sua vez, a activação de GTPases da família Ras<sup>7</sup>.

A  $\text{PLC}\epsilon$ , de 2032 aminoácidos e com 258 kDa<sup>8</sup> é o homólogo humano da *PLC210* descoberta em *C. elegans*. Foram posteriormente isoladas duas variantes, derivadas de splicing alternativo na extremidade amino terminal –  $\text{PLC}\epsilon 1a$  e  $\text{PLC}\epsilon 1b$  – sem que se tenham identificado alterações funcionais entre elas.<sup>7</sup> Sabe-se no entanto que estas variantes têm níveis de expressão distintos em diferentes tecidos tumorais<sup>9</sup>.



Na figura 1 é possível observar a homologia existente entre várias isoformas da família das Fosfolipases C. De notar que apenas a PLC $\epsilon$  possui centros de ligação ao Ras (RA1 e RA2) e domínio com actividade GEF (CDC25 GEF).

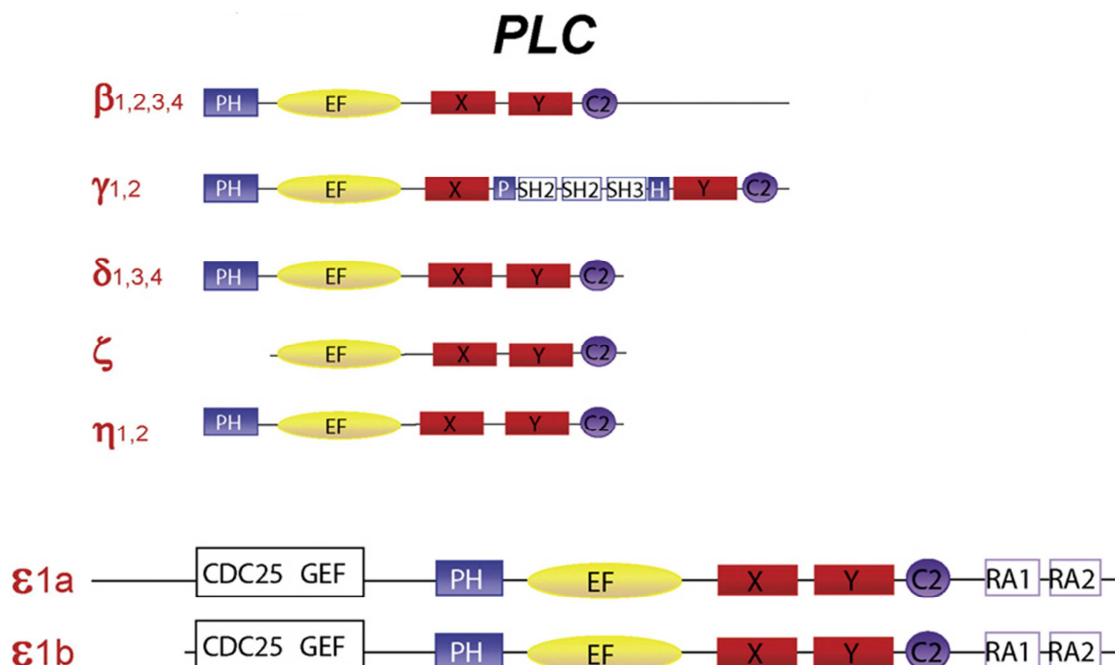


Fig 1: homologia entre várias isoformas de PLC. PH – Pleckstrin Homology; EF – Mão EF; X, Y – centro catalítico; CDC25 GEF – local de troca de guanidina; RA1/2 – local de ligação ao Ras. *Adaptado de [7].*

Graças aos domínios exclusivos da PLC $\epsilon$ , ela é a única PLC capaz de ser activada por sinais mediados por proteínas da família das GTPases (tais como Ras e Rho) e também por sinais dependentes de GPCR, sem que contudo se tenha ainda compreendido completamente de que modo a ligação directa de proteínas G heterotriméricas aumenta a actividade desta enzima<sup>7</sup>.

Este facto faz com que a PLC $\epsilon$  seja um mediador e integrador de sinais vindos de diferentes receptores da superfície celular, como sejam receptores de tirosina-cinase, receptores ligados a proteínas G e CD44, resultando numa cascata de respostas que medeiam vários processos biológicos, como o crescimento, proliferação, e invasão<sup>9</sup>. Poderá ainda desempenhar um papel na apoptose e no desenvolvimento de metástases<sup>9</sup>.

Estudos com linhagens celulares de cancro da bexiga demonstraram que a PLC $\epsilon$  é um inibidor essencial no processo de apoptose, pelas interacções que tem com os genes Bcl2 e Bax, respectivamente supressor e promotor de apoptose; e estudos com células da linhagem T24 revelaram que a sobre-expressão desta enzima estava associada a uma capacidade aumentada para formar tumores e desenvolver metástases<sup>9</sup>.

Simultaneamente é também proposto que o papel desempenhado na tumorigénese pela PLC $\epsilon$  se estenda para lá da inibição da apoptose. De facto, a PLC $\epsilon$  é necessária para que se dê uma sobre-expressão de TNF $\alpha$ , resultando num estado pró-inflamatório na inflamação brônquica; desempenha também um papel na manifestação de hipersensibilidade de contacto e, em astrócitos, a neuroinflamação correlaciona-se com cascatas de sinalização pela PLC $\epsilon$ <sup>9</sup>. Contudo, e o mais relevante tendo em conta o nosso trabalho, prende-se com o facto de esta enzima desempenhar um papel preponderante no CRC, uma vez que facilita os processos de inflamação e angiogénese, essenciais no desenvolvimento desta doença, através da activação de NF- $\kappa$ B<sup>5,9</sup>.

Com este trabalho pretendemos estudar o polimorfismo rs2274223 A>G que acontece no exão 26 do gene da *PLCE1* e a sua associação com o desenvolvimento de cancro colorrectal.

Os trabalhos anteriores foram sobretudo realizados com população asiática – Chineses Han, habitantes do vale de Cashmira – sem que haja o mesmo volume de trabalho com populações de outras partes do globo, o que não permite uma visão mais generalizada do perfil de expressão de *PLCE1*. Para além disso, o estudo deste SNP como possível biomarcador de prognóstico não foi anteriormente avaliado. Nesse sentido, o nosso trabalho tem como objectivo o estudo da associação deste polimorfismo com um risco de desenvolvimento de CRC na população portuguesa, assim como a identificação do seu valor prognóstico. No futuro, análises funcionais deste SNP em linhas celulares e modelos animais serão desejáveis.

## Materiais e Métodos

O DNA foi extraído de amostras de sangue congelado de pacientes (n=74) com diagnóstico confirmado de cancro colorrectal do biobanco de tumores do laboratório do Professor Luís Costa. Foi utilizado o kit de extração de DNA genómico da marca NZYTech. O DNA de indivíduos controlo saudáveis (n=82), equiparados para idade e sexo, foi fornecido, já isolado, pelo Biobanco do IMM.

Posteriormente o DNA foi diluído (5ng/μL) e foi genotipado por qPCR utilizando primers TaqMan pré-feitos definidos e mix (TaqMan Genotyping Master Mix 4371355) compatíveis com e utilizando o equipamento 7500fast da Applied Biosystems. O resultado obtido, pelo software SDS2.3, foi utilizado para correlacionar a existência do polimorfismo re2274223 e CRC, através da análise estatística (Fisher test e Chi-squared). Para tal foi utilizado o GraphPad Prism 7 e o Microsoft Excel.

A análise estatística vai basear-se no cálculo de Odds Ratio (OR), uma vez que este é um estudo retrospectivo. As OR vão dizer-nos se determinada característica “A” está ou não relacionada com o aparecimento da característica “B”. Quando uma OR é superior a 1, significa que a propriedade “A” está de facto associada ao aparecimento de “B”. Não implica, contudo, que “B” seja causa de “A”.

As OR serão calculadas tendo por base uma tabela de dupla entrada onde ser colocam os números de Doentes e Controlos saudáveis e a característica a estudar, como exemplificado na tabela abaixo.

	Doentes	Controlos
Expostos	$D_E$	$C_E$
Não Expostos	$D_N$	$C_N$

$$\text{A OR será resultado de } OR = \frac{D_E/D_N}{C_E/C_N}.$$

Posteriormente é calculado o  $p < 0.05$  e o intervalo de Confiança (CI) de modo a perceber se a associação encontrada tem significância estatística ou se é apenas devida ao acaso.

## Resultados

Após análise dos resultados da qPCR, verificou-se que das 74 amostras apenas se conseguiram obter resultados de 68. Relativamente aos controlos, obtivemos um total de 79 amostras genotipadas da população controlo.

A figura 2 é uma figura representativa da distribuição dos alelos após o final da amplificação. Podem distinguir-se bem três conjuntos diferentes de pontos no gráfico, sendo que cada um deles representa um genótipo distinto, a saber: 1) homozigotia Wild

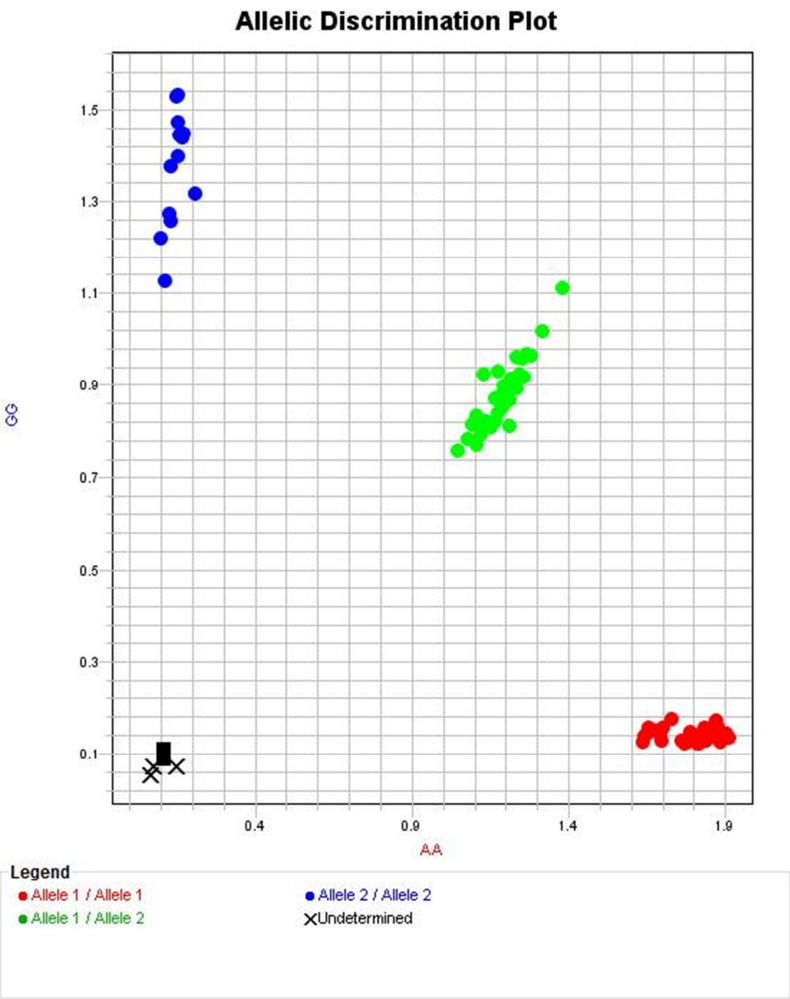


Fig. 2: gráfico da distribuição dos alelos no final da amplificação.

Type (WT) – AA (a vermelho, no canto inferior direito do gráfico);

2) heterozigotia – AG (a verde, no centro do gráfico;

3) homozigotia mutada – GG (azul, no canto superior esquerdo do gráfico).

As cruzes negras no canto inferior esquerdo do gráfico correspondem a amostras não amplificadas, o que pode dever-se ao mau estado do DNA depois de purificado.

Depois de cruzada a informação genotípica dos doentes com a base de dados clínica, foram avaliadas as características dos mesmos, representadas na tabela 1.

Tabela 1: características clínicas dos pacientes com CRC e Controlos saudáveis

		Pacientes	Controlos	P
Idade	Média ± DP	69,23 ± 11,9	68,04 ± 5,34	
	≥65, n	45	60	0.5857
	<65, n	21 <sup>a</sup>	22	

Sexo	Homem, n (%)	40 (58,82%)	48 (60,76%)	0.8674
	Mulher, n (%)	28 (41,18%)	31 (39,24%)	
Estadio	I, n (%)	5 (7%)		
	II, n (%)	24 (35%)		
	III, n (%)	18 (26%)		
	IV, n (%)	17 (25%)		
	Desconhecido	4 (6%)		
T	1/2	7		
	3	42		
	4	14		
	Desconhecido	4 (+1 advt)		
N	0	35		
	1	14		
	2	12		
	3	1		
	Desconhecido	5 (+1 advt)		
M	0	46		
	1	17		
	Desconhecido	4 (+1 advt)		

adtv- adenoma tubuloviloso

a – sem dados de 2 doentes

P obtido pelo Fisher test

Apesar do maior número de amostras do grupo de controlo (n=79) quando comparado com as amostras dos doentes (n=68), verifica-se que os dois grupos estão efectivamente equilibrados no que diz respeito a idade e sexo. Para além disso, a média de idades é superior a 65 anos o que, de acordo com a literatura, é onde ocorre a grande maioria – 80% – dos casos de CRC<sup>10</sup>.

Foi também realizada a análise da prevalência do polimorfismo em cada um dos grupos estudados, que pode ser encontrada nas tabela 2 e 3. Posteriormente foi inferida uma possível associação entre a prevalência do SNP no gene da *PLCE1* com o risco de desenvolver CRC.

Tabela 2: Frequência de rs2274223 em ambas as populações estudadas.

	Pacientes	Controlos
AA (%)	25 (36.76%)	33 (41.77%)
AG/GG (%)	43 (63.24%)	46 (58.23%)

P=0.6125, obtido por Fisher test

Tabela 3: Frequência de rs2274223, isolado por alelos, em ambas as populações estudadas.

	Pacientes	Controlos
AA (%)	25 (36.76%)	33 (41.77%)
AG (%)	34 (50.00%)	33 (41.77%)
GG (%)	9 (13.24%)	13 (16.46%)

P=0.5980, obtido por Chi-quadrado

A diferença de frequência do polimorfismo entre as populações não é estatisticamente significativa ( $p = 0.598$ ).

A percentagem de rs2274223 na literatura varia entre 20.7-60.9% nos pacientes e 23.7-59.9% nos controlos saudáveis<sup>6,11-25</sup>. Na nossa população, temos 63.24% nos pacientes, o valor mais elevado até agora registado.

Verificou-se também que a percentagem de homozigotas mutados (GG) é de 13% nos pacientes e 16% nos controlos, um valor semelhante ao encontrado nas populações Africanas e superior ao valor nas populações asiáticas (as percentagens variam entre 1.9 – 16.7 nos pacientes e entre 1.6 – 16.1 nos controlos<sup>6,11-25</sup>).

De notar ainda que as percentagens mais elevadas de GG são encontradas em Bye et al., num estudo realizado em populações Negra e de Ancestralidade mista. Se compararmos com a população de Ancestralidade mista, estes valores são de 18.1% nos casos e 16.2% nos controlos. Os valores mais altos depois destes são encontrados em

Kupcinskas et al. num estudo realizado numa população europeia. Estes resultados permitem colocar a hipótese de tanto a existência deste polimorfismo como a homozigotia serem mais características de populações europeias.

Os resultados da análise à associação entre o polimorfismo rs2274223 e CRC (GG v. AA, GG v. AG, GG v. AA/AG, AA v. AG/GG) estão na tabela 4.

Tabela 4: resultados da associação entre rs2274223 e CRC.

	OR	p	95% CI
GG v. AA	0.9138	>0.9999	0.3456-2.528
GG v. AG	0.6719	0.4689	0.2635-1.777
GG v. AA/AG	0.7744	0.6478	0.327-1.835
AA v. AG/GG	0.8104	0.6125	0.427-1.61
AA v. AG	0.7363	0.4730	0.3544-1.495
AA v. GG	1.094	>0.9999	0.3956-2.893

Não sendo nenhum dos resultados estatisticamente significativos, a tendência evidenciada é que rs2274223, em homozigotia, tem um efeito protector em relação ao desenvolvimento de CRC na população portuguesa.

Nas tabelas 5 e 6 temos a distribuição alélica da nossa população em estudo por idade ( $\geq 65$  e  $< 65$ ).

Tabela 5: distribuição por idade e alelos dos casos de CRC, n (%).

	AA	AG	GG
$\geq 65$	16 (24.24%)	22 (33.33%)	7 (10.61%)
$< 65$	9 (13.24%)	11 (16.67%)	1 (1.52%)

Tabela 6: distribuição por idade e alelos nos Controlos saudáveis, n (%)

	AA	AG	GG
$\geq 65$	26 (32.91%)	21 (26.58%)	11 (13.92%)
$< 65$	7 (8.86%)	12 (15.19%)	2 (2.53%)

A análise estatística formal revelou que não existe diferença significativa para a associação entre possuir determinado alelo e desenvolver CRC antes ou depois dos 65 anos de idade.



Posteriormente foi desenhada uma curva de sobrevivência para avaliar a repercussão desta mutação nos pacientes com CRC.

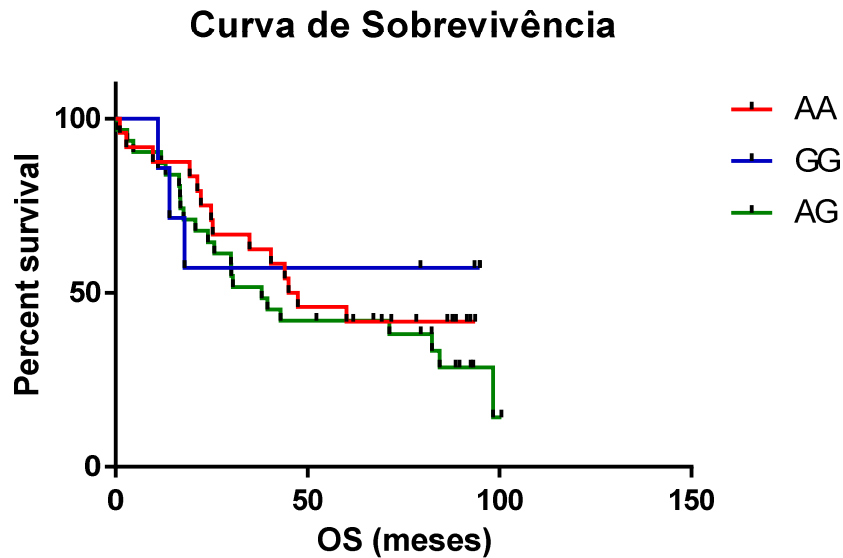


Gráfico 1: curva de sobrevivência para as 3 variantes alélicas estudadas.

Quando comparadas as 3 curvas, temos um  $p < 0.0001$  em todos os testes estatísticos realizados, o que nos diz que a diferença entre elas é estatisticamente significativa. As percentagens de sobreviventes são para os AA de 41.47%, AG de 14.30% e GG de 57.14%. O que significa que os doentes com CRC na população estudada que possuem o polimorfismo rs2274223 em homozigotia são os que sobrevivem mais tempo, quando comparado com os outros, indicando que este genótipo parece ser, mais uma vez, protector.

## Discussão

Neste estudo de casos e controlos investigámos a associação entre o SNP rs2274223, uma alteração *missense* na sequência de DNA que causa a substituição de histidina por arginina, no centro regulatório e de ligação aos fosfolípidos na PLC $\epsilon$ 1 e o risco de CRC na população portuguesa. Foi traçada uma curva de sobrevivência para as variantes alélicas estudadas que revelou, com significância estatística –  $p < 0.001$  – que, na nossa população, os doentes que possuíam este SNP viviam mais tempo que aqueles que o não têm (46.25 meses AA, 38 meses AG e indefinido para GG). Destaca-se ainda que, contrário ao que seria expectável, a homozigotia WT (AA) tem um maior benefício na sobrevivência que a heterozigotia (AG). Foram ainda realizadas outras análises estatísticas que, apesar de não terem significância estatística, revelaram uma tendência protectora para este polimorfismo em relação:

1) ao desenvolvimento do CRC globalmente – GG v. AA (OR=0.9138,  $p > 0.9999$ , 95% CI: 0.3456-2.528); GG v. AG (OR=0.6719,  $p = 0.4689$ , 95% CI: 0.2635-1.777), GG v. AA/AG (OR=0.7744,  $p = 0.6478$ , 95% CI: 0.327-1.835) e AA v. AG/GG (OR=0.8104,  $p = 0.6125$ , 95% CI: 0.4247-1.61);

No que diz respeito à frequência deste polimorfismo nos casos de CRC na nossa população, verificou-se que é superior a todas as outras analisadas neste trabalho. De considerar também que as maiores frequências até agora registadas são em populações europeias o que é congruente com o observado. Uma explicação poderia ser dada pela hipótese de existir um menor *Linkage Disequilibrium* (LD) destes loci na população Europeia. Assim sendo, não seria este SNP o responsável pelo desenvolvimento do cancro na população Chinesa mas antes outros polimorfismos que acompanham este, com um alto LD. Outra hipótese é que a carcinogénese dependente deste polimorfismo se dê de maneiras diferentes entre distintas populações.

Ao contrário do descrito em populações asiáticas, onde a presença deste polimorfismo está associada ao aumento da incidência de cancro no geral<sup>3,26,11</sup>, e também de CRC<sup>4-6</sup>, na população analisada, a presença do polimorfismo em homozigotia (GG) revelou um efeito protector no desenvolvimento global de CRC.

Sabe-se que o CRC desenvolvido antes dos 65 anos é normalmente diagnosticado em estadios mais avançados e tem uma menor taxa de sobrevivência<sup>27</sup>. Por isto foi investigada uma possível associação entre este polimorfismo e a presença de CRC antes e após os 65 anos, mas tal não foi verificada.



Para além de poder ser activada por várias moléculas, o padrão de expressão da enzima varia consoante o tipo de tecido onde está presente, fazendo com que possa ser um oncogene ou um gene supressor de tumores<sup>15,28</sup>. Exemplo disso é o facto do mRNA de PLCε em tecido de adenocarcinoma do esófago se encontrar sobre-expresso (o que conferiria à enzima um papel oncogénico)<sup>28</sup>, contrariamente ao padrão de expressão encontrado em tecidos de adenocarcinoma rectal, em que está sub-expresso, o que conferiria à enzima um papel de gene supressor de tumor<sup>30,31</sup>.

Uma forma comum de inactivar genes supressores de tumor é a hipermetilação do promotor<sup>32</sup> e vários estudos tinham já demonstrado que a hipermetilação de *PLCE1* era essencial para a sua transcrição<sup>9</sup>. De facto, a expressão de PLCε varia ao longo do desenvolvimento de CRC – vai sendo cada vez menor ao longo do desenvolvimento do tumor e é de novo sobreexpressa durante a fase de metastização<sup>28,32</sup>. Contudo, não foi ainda possível determinar que o promotor de *PLCE1* seja passível de ser metilado<sup>32</sup>.

Esta enzima faz parte da cadeia de sinalização de fosfolípidos, que tem importância definida na carcinogénese, e com efeitos em vários processos celulares críticos no desenvolvimento do cancro: proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e crescimento do tumor.

A mutação rs2274223A>G representa uma substituição de um aminoácido num domínio regulatório da enzima (C2)<sup>23</sup>, que poderá ter como consequência uma alteração da actividade enzimática desta proteína, com inevitável impacto nas cadeias de sinal a jusante da mesma.

A literatura coloca o papel de PLCε1 no CRC como sendo um supressor de tumor e este polimorfismo pode significar um decréscimo da actividade ou uma alteração conformacional que impossibilite a actuação da enzima. Contudo, fica por explicar a diferença de sobrevivência entre os heterozigóticos e os homozigóticos mutados nos nossos resultados.

Podemos apenas teorizar que no caso da presença do polimorfismo em homozigotia, este de algum modo anule o efeito que a presença de apenas um alelo tem no silenciamento genético. Ou ainda que o nível de actividade da enzima seja mais afectado quando há formas com arginina e histidina em simultâneo na mesma célula. Contudo, para validar esta hipótese seria necessário realizar testes funcionais *in vivo* e *in vitro*.

Sabe-se que a inflamação e a angiogénese desempenham também um importante papel no desenvolvimento de CRC<sup>33,34</sup>, e de facto vários trabalhos referem uma relação

entre a activação da PLC $\epsilon$ 1 e a expressão de NF- $\kappa$ B<sup>5,9,31</sup> que é essencial para manter um estado inflamatório que sustenha o crescimento do tumor<sup>34</sup> mas a expressão de PLC $\epsilon$ 1 varia consoante o estado tumoral<sup>34</sup> (menor durante o princípio e aumenta com a metastização<sup>28</sup>). Contudo, por falta de informação relativa aos doentes estudados, não foi possível neste trabalho avaliar o impacto que os factores ambientais (consumo de álcool e tabaco) desempenham no desenvolver da inflamação e de CRC.

O nosso trabalho avaliou também a sobrevivência da população com rs2274223 em homozigotia dava vantagem na sobrevivência ao CRC, em linha com o que acontece no cancro gástrico<sup>20</sup> ainda que no nosso estudo isso se tenha apenas verificado em casos de homozigotia (a heterozigotia era até o genótipo mais desfavorável).

## Conclusão

Este trabalho permitiu avaliar a frequência do polimorfismo rs2274223 numa amostra da população com CRC e conseguiu demonstrar-se, não obstante o tamanho reduzido da amostra (68 pacientes/ 82 controlos) que há uma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos homozigotas mutados (GG) em relação aos outros genótipos.

Tentou verificar-se se existia ou não associação entre este SNP e o risco de desenvolver CRC antes dos 65 anos mas, após análise estatística, tal não se evidenciou.

O facto de GG se mostrar protector em relação ao desenvolvimento de CRC e aumentar a sobrevivência em doentes com CRC abre a porta a que esta mutação possa no futuro ser utilizada como biomarcador para estas mesmas características.

No futuro pretendemos aumentar a nossa coorte de amostras de forma a tornar mais robustos os resultados obtidos e explorar se as tendências observadas têm significância estatística. Pretendemos também recolher mais informação clínica dos pacientes analisados, como exemplo consumo de álcool e tabaco, de forma a analisar possíveis associações de risco entre este SNP e factores ambientais que têm provada uma associação a CRC. Ressalta-se também que as análises realizadas neste trabalho foram todas uni-variadas, verificando-se a necessidade de análises mais robustas e concretas de forma a poder inferir concretamente sobre o poder deste SNP no risco de desenvolver CRC.

Ainda, de modo a poder caracterizar melhor o papel do SNP da PLC $\epsilon$ 1 na tumorigénese de CRC seria necessário realizar ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo* que permitissem identificar qual o papel da alteração de uma histidina por uma arginina na proteína.

## Bibliografia

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
2. Li F-X, Yang X-X, He X-Q, Hu N-Y, Wu Y-S, Li M. Association of 10q23 with colorectal cancer in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012;39(10):9557-9562. doi:10.1007/s11033-012-1820-8.
3. Xue W, Zhu M, Wang Y, He J, Zheng L. Association between PLCE1 rs2274223 A > G polymorphism and cancer risk: proof from a meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:7986. doi:10.1038/srep07986.
4. Zhang Y, Gong Y, Du S, Yan M, Geng T, Feng T, Wang J J. The association between phospholipase C epsilon gene (PLCE1) polymorphisms and colorectal cancer risk in a Chinese Han population: a case-control study. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):19360-19366. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694476/>.
5. Duan X, Li X, Lou H, et al. Genetic association of PLCE1, C11orf92-C11orf93, and NOC3L with colorectal cancer risk in the Han population. *Tumor Biol*. 2014;35(3):1813-1817. doi:10.1007/s13277-013-1242-9.
6. Wang Q, Chen P, Chen D, Liu F, Pan W. Association between phospholipase C epsilon gene (PLCE1) polymorphism and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J Int Med Res*. 2014;42(2):270-281. doi:10.1177/0300060513492484.
7. Smrcka A V., Brown JH, Holz GG. Role of phospholipase Cε in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal*. 2012;24(6):1333-1343. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.009.
8. GeneCards. PLCE1 Gene. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLCE1>. Published 2017. Accessed June 29, 2017.
9. Zhang R-Y, Du W-Q, Zhang Y-C, Zheng J-N, Pei D-S. PLCε signaling in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(4):715-722. doi:10.1007/s00432-015-1999-x.
10. Boardman LA, Litzelman K, Seo S, et al. The association of telomere length with colorectal cancer differs by the age of cancer onset. *Clin Transl Gastroenterol*. 2014;5(3):e52. doi:10.1038/ctg.2014.3.
11. Ezgi O, Merve A, Hakan YT, Gül Ö. Genetic Variations in Phospholipase C-epsilon 1 (PLCE1) and Susceptibility to Colorectal Cancer Risk. *Biochem Genet*. 2016;1. doi:10.1007/s10528-016-9759-4.
12. Gu H, Ding G, Zhang W, et al. Replication study of PLCE1 and C20orf54 polymorphism and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):9105-9111. doi:10.1007/s11033-012-1782-x.

13. Piao J, Shin M, Kim HN, et al. Replication of results of genome-wide association studies on esophageal squamous cell carcinoma susceptibility loci in a Korean population. *Dis esophagus*. 2014;27(January 2004):798-801. doi:10.1111/dote.12155.
14. Wang M, Zhang R, He J, et al. Potentially functional variants of PLCE1 identified by GWASs contribute to gastric adenocarcinoma susceptibility in an Eastern Chinese population. *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0031932.
15. Zhou RM, Li Y, Wang N, Liu BC, Chen ZF, Zuo LF. PLC-ε1 Gene Polymorphisms Significantly Enhance the Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Individuals with a Family History of Upper Gastrointestinal Cancers. *Arch Med Res*. 2012;43(7):578-584. doi:10.1016/j.arcmed.2012.09.006.
16. Malik MA, Umar M, Gupta U, Zargar SA, Mittal B. Phospholipase C Epsilon 1 (PLCE1 rs2274223A > G, rs3765524C > T and rs7922612C > T) Polymorphisms and Esophageal Cancer Risk in the Kashmir Valley. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(10):4319-4323. doi:10.7314/apjcp.2014.15.10.4319.
17. Umar M, Upadhyay R, Kumar S, Ghoshal UC hand, Mittal B. Role of novel and GWAS originated PLCE1 genetic variants in susceptibility and prognosis of esophageal cancer patients in northern Indian population. *Tumour Biol*. 2014;35(11):11667-11676. doi:10.1007/s13277-014-2458-z.
18. Sharma KL, Umar M, Pandey M, et al. Association of potentially functional genetic variants of PLCE1 with gallbladder cancer susceptibility in North Indian population. *J Gastrointest Cancer*. 2013;44(4):436-443. doi:10.1007/s12029-013-9537-z.
19. Song H-R, Kim HN, Kweon S-S, et al. Common genetic variants at 1q22 and 10q23 and gastric cancer susceptibility in a Korean population. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3133-3137. doi:10.1007/s13277-013-1409-4.
20. Luo D, Gao Y, Wang S, et al. Genetic variation in PLCE1 is associated with gastric cancer survival in a Chinese population. *J Gastroenterol*. 2011;46(11):1260-1266. doi:10.1007/s00535-011-0445-3.
21. Duan F, Xie W, Cui L, et al. Novel functional variants locus in PLCE1 and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma: Based on published genome-wide association studies in a central Chinese population. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(5):647-652. doi:10.1016/j.canep.2013.04.009.
22. Dura P, Bregitha C V, te Morsche RH, et al. GWAS-uncovered SNPs in PLCE1 and RFT2 genes are not implicated in Dutch esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma etiology. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(5):417-419. doi:10.1097/CEJ.0b013e32835c7f53.
23. Bye H, Prescott NJ, Lewis CM, et al. Distinct genetic association at the PLCE1 locus with oesophageal squamous cell carcinoma in the South African population. *Carcinogenesis*. 2012;33(11):2155-2161. doi:10.1093/carcin/bgs262.



24. Kupcinskas J, Gyvyte U, Bruzaite I, et al. Common Genetic Variants of PSCA, MUC1 and PLCE1 Genes are not Associated with Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):6027-6032. doi:10.7314/APJCP.2015.16.14.6027.
25. Ma H, Wang L-E, Liu Z, Sturgis EM, Wei Q. Association between novel PLCE1 variants identified in published esophageal cancer genome-wide association studies and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*. 2011;11(1):258. doi:10.1186/1471-2407-11-258.
26. Zhang X, Zhang Y, Gu D, et al. Increased Risk of Developing Digestive Tract Cancer in Subjects Carrying the PLCE1 rs2274223 A>G Polymorphism: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(10):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0076425.
27. Lee J, Kim I-H, Kim JS, et al. Different clinical characteristics in sporadic young-age onset colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(37):e4840. doi:10.1097/MD.0000000000004840.
28. Tyutyunnykova A, Telegeev G, Dubrovskaya A. The controversial role of phospholipase C epsilon (PLCε) in cancer development and progression. *J Cancer*. 2017;8(5):716-729. doi:10.7150/jca.17779.
29. Martins M, McCarthy A, Baxendale R, et al. Tumor suppressor role of phospholipase C in Ras-triggered cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(11):4239-4244. doi:10.1073/pnas.1311500111.
30. Umar M, Upadhyay R, Mittal B. PLCE1 rs2274223 A>G polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Tumor Biol*. 2013;34(6):3537-3544. doi:10.1007/s13277-013-0932-7.
31. Wang LD, Bi X, Song X, et al. A sequence variant in the phospholipase C epsilon C2 domain is associated with esophageal carcinoma and esophagitis. *Mol Carcinog*. 2013;52(SUPPL1):80-86. doi:10.1002/mc.22016.
32. Danielsen SA, Cekaite L, Ågesen TH, et al. Phospholipase C isozymes are deregulated in colorectal cancer - insights gained from gene set enrichment analysis of the transcriptome. *PLoS One*. 2011;6(9). doi:10.1371/journal.pone.0024419.
33. Janakiram NB, Rao C V. The Role of Inflammation in Colon Cancer. In: Bharat B. Aggarwal, Bokyoung Sung SCG, ed. *Inflammation and Cancer*. Springer Basel; 2014:25-52. doi:10.1007/978-3-0348-0837-8.
34. Li M, Edamatsu H, Kitazawa R, Kitazawa S, Kataoka T. Phospholipase Cε promotes intestinal tumorigenesis of ApcMin/+ mice through augmentation of inflammation and angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2009;30(8):1424-1432. doi:10.1093/carcin/bgp125.